

## Thrombocyta funkciós rendellenességek területén végzett vizsgálatok

### 1. Glanzmann thrombasthenia

#### a) II-es típusú Glanzmann thrombasthenia

Közepes súlyosságú vérzékenységben szenvedő férfibetegünk esetében II-es típusú Glanzmann thrombastheniát diagnosztizáltunk. A thrombocyta aggregáció hiányát és az alvadék retrakció megtartottságát jól magyarázza, hogy áramlásos citometriai vizsgálatokban igazoltuk a fibrinogén receptor komplex mindkét komponensének, a glikoprotein (GP) IIb-nek és IIIa-nak erősen csökkent thrombocyta sejtfelszíni expresszióját (a normál 4,5 %-a). A beteg thrombocytáinak lizátumában is erősen csökkent mennyiségű GPIIb és GPIIIa fehérje volt kimutatható (a normál 6, ill. 16%-a). DNS szekvenálással három, eddig nem közölt mutációt találtunk a GPIIb génjében heterozigóta formában. A c.1771\_1772insG mutáció olvasási keret eltolódást és korai terminációt okoz az 575. aminosavnál (p.Asp560GlyfsX16; X575GPIIb). A c.339C>G pontmutáció Leu116Val aminosav cserével, a c.2437C>A pontmutáció pedig His782Asn aminosav cserével jár. A beteg thrombocytáiban a c.1771\_1772insG mutációt hordozó allélt képviselő mRNS nem volt kimutatható, ami arra utal, hogy a mutáns GPIIb-mRNS ún. nonszensz mutáció mediálta lebomlással eliminálódik. Mindhárom mutáns GPIIb fehérjét BHK sejtekben expresszáva a következő eredményeket kaptuk:

Az X575GPIIb fehérje limitált mennyiségben, trunkált proteinként jelent meg az immunprecipitációt követő Western blot-on, az anti-GPIIIa antitesttel nem koimmunprecipitálódott, azaz nem képes komplexet alkotni a GPIIIa-val. Mivel a mutáció a „thigh” doménben van és egy másik általunk korábban kimutatott thigh domén mutáció hasonló következményekkel járt, kimondhatjuk, hogy a thigh domén egy részének hiánya vagy eltorzulása nem engedi meg, hogy a kötődésért felelős N-terminális  $\beta$ -propeller domén felvegye a GPIIIa-hoz való kötődéshez szükséges megfelelő orientációt.

A His782Asn mutáns fehérje éretlen formája (pro-GPIIb) a vad típushoz hasonlóan, míg érett formája erősen csökkent mennyiségben található a transzfektált BHK sejtekben. A mutáns fehérje sejtfelszíni expressziója erőteljesen csökkent, intracellulárisan az ER-ben normál, a Golgiban azonban szignifikánsan csökkent mennyiségben volt kimutatható. A pulse-chase kísérletek szerint a His782Asn fehérje érése késleltetett, melynek oka a mutáns fehérje intracelluláris transzportjának a zavara az ER és a Golgi között.

A Leu116Val mutáns fehérje a vad típusú fehérjével mindenben megegyezett, ami igazolja, hogy betegséget nem okozó polimorfizmusról van szó.

A témából készített közlemény megjelent (Losonczy G, Rosenberg N, Boda Z, Vereb G, Kappelmayer J, Hauschner H, Bereczky Z, Muszbek L. Three novel mutations in the glycoprotein IIb gene in a patient with type II Glanzmann thrombasthenia. Haematologica 2007; 92: 698-701).

#### b) Variáns típusú Glanzmann thrombasthenia.

Felfedeztünk egy új Glanzmann thrombastheniás beteget, a beteg semmiféle agonistára nem adott aggregációs választ. Az alvadék nem retrahált, ugyanakkor az áramlásos citometriával meghatározott felszíni fibrinogén receptor száma nem csökkent lényegesen (50% körül volt), ami arra utalt, hogy rendkívül ritka, variáns típusú Glanzmann betegségről van szó. A molekuláris genetikai analízis bizonyította a variáns típusú Glanzmann thrombastheniát. A mutáció, mely ellentétben az előző esettel, itt a GPIIIa génben van, a GPIIIa intracitoplazmatikus doménjében egy arginint kódoló CGA helyett TGA Stop kodont, így 37 aminosavval rövidebb fehérjét eredményez. A mutációt eddig csak heterozigóta formában írták le. A homozigóta forma fehérje szintű vizsgálatától új

információk várhatók a fibrinogén receptor szignalizáció területén. Az eddigi munkából elfogadtak egy előadást a European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Innsbruck 2009-en (Bagoly Z, Fazakas F, Marosi A, Tóth J, Kappelmayer J, Muszbek L. Variant type Glanzmann thrombasthenia: molecular genetic, prenatal and protein diagnostics.). A munka befejezése és közlemény formában történő megjelentetése már áthúzódik a következő pályázati periódusra.

2. Tromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) szignalizációs út rendellenessége

Egy vérzékeny férfibetegnél a thrombocyta aggregációs és szekréción vizsgálatok alapján a TXA<sub>2</sub> receptor és/vagy az ahhoz kapcsolódó szignalizációs útvonal zavara merült fel. A TXA<sub>2</sub> receptor gént amplifikáltuk és szekvenáltuk, de csak aminosav cserével nem járó, illetve betegséget biztosan nem okozó gyakori polimorfizmusokat találtunk. Az eredmények alapján feltételezhető, hogy a betegség hátterében a receptor mediált szignalizációs útvonal zavara áll. Ennek felderítésére foszforilációs és proteomikai kísérleteket végeztünk, de még nem sikerült identifikálni a hibás gént.

3. Ritka von Willebrand betegség típusok

Három ilyen betegünk volt, akiknek a vizsgálatára beállítottuk a von Willebrand faktor gén szekvenálását, ill. megpróbáltunk a fenotípus egzaktabb karakterizálására egy új értékelési módszert kidolgozni. A betegséget okozó mutációkat kiderítettük, ezek közül azonban egyik sem volt új mutáció, így további vizsgálatuknak nem volt értelme.

E betegségcsoport pontos altípusba sorolása érdekében nélkülözhetetlen multimer analízis SDS-gélelektroforézissel történik. A módszer standardizálása érdekében a multimer eloszlást denzitométerrel kvantitálhatóvá tettük, az értékelést standardizáltuk. A módszert az International Society of Thrombosis and Haemostasis Genf-i Kongresszusán (2007) ismertettük (Udvardy ML, Szekeres-Csiki K, Papp M, Hársfalvi J. Quantitation of von Willebrand factor multimer distribution by densitometry. Absztrakt #P-W 198. J Thromb Haemost 5, Suppl. 2, 2007). Azóta a munkából elkészült a közlemény, amit benyújtottunk közlésre a Thrombosis and Haemostasis folyóirathoz.

**A coagulopathiák területén végzett vizsgálatok**

1. Öröklött X-es faktor (FX) deficienciák

A súlyos vérzékenységet mutató 1% alatti FX aktivitással és antigén szinttel rendelkező gyermek tüneteinek hátterében a Gly204Arg aminosav cserével járó pontmutáció homozigóta formája állt. A mutáció strukturális és funkcionális következményeink vizsgálatára a vad típusú és a mutáns FX fehérjét HEK293 sejtekben expresszáltuk. ELISA-val, immunoblottinggal, immunfluoreszcenciás és pulse-chase vizsgálatokkal igazoltuk, hogy mind a vad típusú, mind a mutáns fehérje expresszáldott, de a sejtek csak a vad típusú FX-et szekretálták. Az Arg204 FX intracellulárisan akkumulálódott, majd degradálódott. Kettős immunfluoreszcens festéssel, CLSM technikával megállapítottuk, hogy az Arg204 FX az ER-rel és cisz-Golgival nem, a transz-Golgival azonban jó kolokalizációt mutatott, így feltehető, hogy a normál szekretoros útvonalról letérve a mutáns fehérje a transz Golgi, késői endoszóma szintjén reked meg. A molekula modellezés és energetikai számítások azt jelzik, hogy a mutáns fehérjében olyan strukturális változások jönnek létre, melyek magyarázhatják intracelluláris transzportjának zavarát. Az eredményeket összefoglaló angol nyelvű közlemény megjelent (Bereczky Z, Komáromi I, Bárdos H, Kiss C, Haramura G, Ajzner É, Ádány, R, Muszbek L. Factor X<sub>Debrecen</sub>: Gly204Arg mutation in factor X causes the synthesis of a non-secretable protein and severe factor X deficiency. Haematologica 2008; 93: 299-302).

A másik FX hiányos beteg szintén 1% alatti FX aktivitással rendelkezik és súlyos agyvérzést szenvedett csecsemőkorban. A beteg összetett heterozigóta a Thr233Met és Trp308Leu aminosav cseréket okozó pontmutációkra. A beteg a Thr233Met mutációt édesapjától, a Trp308Leu mutációt édesanyjától örökölte. A mutációkat hordozó plazmidokat „site-directed“ mutagenezissel előállítottuk, majd a vad típusú és a mutáns FX fehérjéket HEK293 sejtekben expresszáltuk. Western blot és ELISA vizsgálatokban mind a vad típusú, mind a mutáns fehérjék kimutathatóak voltak a HEK293 sejtekben, a Met233 FX kis, a Leu308 FX jelentősebb mennyiségben, a sejtek tápfolyadékában azonban egyik mutáns FX fehérje sem jelent meg. A mutáns FX fehérjék sorsát pulse-chase kísérletekben követve megállapítottuk, hogy míg szintézist követően a vad típusú fehérje mennyisége gyorsan csökken a sejtekben és ezzel párhuzamosan megjelenik a sejtek médiumában, a mutáns FX fehérjék szekretálódni nem képesek. A Met233 FX gyorsan, a Leu308 FX lassabban degradálódik sejten belül. A mutáns FX fehérjék intracelluláris lokalizációját kettős immunfluoreszcens festéssel, CLSM technikával állapítottuk meg. A Met233 FX az endoplazmatikus retikulummal, a Leu308 FX pedig a transz-Golgi/késői endoszóma markerekkel mutatott jó kolokalizációt. A molekula modellezés eredményei alapján feltételezhető, hogy a Thr233Met mutáció következtében egy intramolekuláris diszulfid híd kialakulása elmarad, ami befolyásolja a mutáns fehérje foldingját, ezáltal instabillá téve az egész molekulát. A Trp308Leu mutáció esetében a FX nehéz és könnyű lánc között lévő kapcsolat gyengül. Mindezek alapján megállapítható, hogy a Thr233Met mutáció az intracelluláris érési folyamat során korábban (valószínűleg már az ER-ben), a Trp308Leu mutáció pedig később (a transz-Golgi/késői endoszóma szintjén) okozza a mutáns FX fehérjék lebomlását. A témából kongresszusi előadás készült (The International Society on Thrombosis and Haemostasis XXI. Congress, Genf, Svájc, 2007. Bereczky Z, Szabó T, Haramura G, Komáromi I, Muszbek L. Two novel missense mutations (Thr233Met and Trp308Leu) in the factor X gene and their functional consequences in a patient with severe factor X deficiency. Absztrakt #O-M 024. J Thromb Haemost 5, Suppl. 2, 2007).

## 2. Öröklött VII-es faktor (FVII) deficienciák

Összesen 6 FVII hiányos beteget diagnosztizáltunk, s mind a hat esetben megtörtént a molekuláris genetikai vizsgálat is. **Négy** betegnél már ismert mutációkat találtunk, 2 beteg esetében azonban eddig le nem írt mutációkat fedeztünk fel. A súlyos FVII deficiens fiatal nőbetegünkönél Glu7Gly aminosav cserével járó pontmutációt találtunk homozigóta formában. A FVII aktivitás 3%, a FVII antigén szint 33% volt (azaz a deficiencia az ún. CRM<sup>RED</sup> altípusba sorolható). Egy további súlyos FVII deficiens beteg esetében két új mutációt (C368F és kodon404delC) fedeztünk fel kettős heterozigóta kombinációban. A rokonok analízise és a molekula modellezés megtörtént, az expressziós vizsgálatok azonban áthúzódnak a 2009-ben kezdődő pályázat kutatási periódusára.

## 3. Faktor XIII (FXIII) deficiencia vizsgálata

### a) Szerzett súlyos FXIII deficiencia, a FXIII deficiencia egy új formája

SLE-ben szenvedő betegünk vérzéseiinek hátterében <1% FXIII aktivitást, FXIII A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> komplex, FXIII-A és FXIII-B antigén szinteket találtunk. Ugyanakkor a beteg thrombocytaiban mind a FXIII aktivitás, mind a FXIII-A antigén szint normál volt. A beteg szérumból izolált IgG sem a tisztított FXIII A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> aktivációt, sem a trombin aktivált FXIII transzglutamináz aktivitását nem gátolta, ugyanakkor ELISA rendszerben erősen kötődött a tisztított FXIII A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>-höz és a FXIII-B alegységhez, a FXIII-A alegységhez azonban nem. Western blottinggal igazoltuk, hogy a FXIII-B alegységhez való antitest

kapcsolódás csak nem redukáló körülmények között történik meg, ami a FXIII-B alegységen lévő strukturális epitóphoz kapcsolódó autoantitest jelenlétét bizonyítja. Az antitestet kötő epitóp a tripszines emésztés kezdeti fázisában tönkremegy. A FXIII normál féléletideje 11 nap a keringésben, a beteg esetében mindössze 17 órás féléletidőt figyeltünk meg. Ez arra utal, hogy az autoantitest immunkomplexet képez a szabad és a komplexben lévő FXIII-B alegységgel, mely gyorsan eliminálódik a keringésből. A FXIII-B ellenes antitest által okozott FXIII hiányt még senki sem írt le, azaz egy új megbetegedést fedeztünk fel és leírtuk a laboratóriumi diagnózis módszereit és algoritmusát. A munkát a szakterület elsőszámú folyóirata, a Blood közölte (Ajzner É, Schlamadinger Á, Kerényi A, Bereczky Z, Katona É, Haramura G, Boda Z, Muszbek L. Severe bleeding complications caused by an autoantibody against the B subunit of plasma factor XIII; a novel form of acquired factor XIII deficiency. 2009; 113: 723-5).

*b) Öröklött Faktor XIII hiány*

Résztvettünk az öröklött FXIII deficienciák nemzetközi regiszterének a továbbfejlesztésében. A regiszter 104 öröklött FXIII deficienciában szenvedő beteg adatait tartalmazza. Az adatokból lényeges következtetések vonhatók le a FXIII hiányban jelentkező vérzékenységi és egyéb (sebgyógyulási zavar, spontán abortusz) tünetek gyakoriságára. A tanulmány összegzi a betegséget okozó mutációkat, a founder effektusokat, a terápiás gyakorlatokat, a diagnózis problémáit, s minden bizonnyal hasznos segítséget jelent a betegség jobb megértésében, a klinikusoknak a terápia megtervezésében és a kutatóknak további tanulmányok folytatásához. A közölt publikáció a Thrombosis and Haemostasis folyóiratban jelent meg (Ivaskevicius V, Seitz R, Kohler HP, Schroeder V, Muszbek L, Ariens RAS, Seifried E, Oldenburg J. International registry on factor XIII deficiency: A basis formed by mostly European data. Thromb Haemost 2007; 97: 914-21). A 2007-es Womens' Health Issues in Thrombosis and Haemostasis kongresszusra a témavezetőt felkérték egy összefoglaló előadás megtartására a FXIII deficienciák és a terhesség témakörében. Az előadás kivonata a Thrombosis Research supplementumában jelent meg (Muszbek L, Bagoly Z. Fibrin formation disorders and pregnancy loss. Thromb Res 2007; 119: S69-70).

Az öröklött FXIII hiány klinikumát és laboratóriumi diagnosztikáját egy felkért közleményben foglaltuk össze. (Karimi M, Bereczky Z, Kahan N, Muszbek L. Factor XIII deficiency: clinical manifestations and laboratory diagnostics, Semin Thromb Haemost accepted, 2009).

**4. Öröklött V-ös faktor (FV) deficiencia**

Egy fiatal nőbetegnél műtétek kapcsán jelentkező súlyos vérzéses szövődmények háttérében V-ös faktor deficienciát igazoltunk. A FV aktivitása az egyfázisú alvadási tesztben ismételt vizsgálatok esetében 27%-nak ill. 37%-nak bizonyult. A FV antigén szintje a plazmában 38%, a trombocitákban 59% volt. A teljes FV gént fluoreszcens direkt szekvenálással vizsgálva több mutációt azonosítottunk. Ezek közül egy aminosav cserével nem járó csendes mutáció (c.A327G, Gln51) és két ismert polimorfizmus (c.A2863G, Lys895Glu és c.A5380G, Met1736Val) mellett egy eddig még nem leírt, a betegséggért feltehetően felelős pontmutációt is találtunk. A mutáció a FV gén 10. exonjában c.G1651A nukleotid csere, mely a FV fehérje A2 doménjében Gly493Arg aminosav cserével jár. Száz, hemosztázis tekintetében egészséges (vérzéses tüneteket nem mutató) egyén FV gén vizsgálatakor a Gly493Arg mutáció egyetlen esetben sem volt kimutatható. A beteg idősebbik lánygyermekének FV aktivitása 86% volt, a két ismert polimorfizmusra nézve heterozigótának bizonyult, a Gly493Arg mutációra nézve vad típusú volt. A

fiatalabbik lánygyermek FV aktivitása 35% volt, ez a gyermek a Gly493Arg mutációt heterozigóta formában hordozta, a két polimorfizmusra nézve azonban vad típusú volt. A csendes mutációt mindkét gyermek hordozta heterozigóta formában. A Gly493Arg mutáció strukturális következményeinek vizsgálata molekula modellezéssel folyamatban van. A vizsgálat befejezése, az eredmények közlése áthúzódik a következő pályázati periódusra.

Az alábbiakban a projekt három legfontosabb eredményét soroljuk fel:

1/Két új mutációnak a felfedezése a trombocita glikoprotein (GP) IIb-ben, melyek II-es típusú Glanzmann thrombastheniát okoztak. A mutáns fehérjék transzfektált sejtekben történő analízise rávilágított: a) a "thigh" domén szerepére a GPIIIa-val való komplex képződésben, b) a "calf-2" domén fontosságára a fehérje érési folyamatában és intracelluláris vándorlásában.

2/ A factor X (FX) génjében bekövetkezett homozigóta c.730G>A/p.Gly204Arg mutáció következtében a FX antigén hiányát észleltük egy súlyos vérzékenységben szenvedő gyermekben. Az aminosav csere destabilizálta a FX két láncát összetartó diszulfid hidat. A mutáns fehérje eltérül a normális szekréciós úttól, megakad a transz Golgi-késő endoszóma szinten, s így nem szekretálódik.

3/ Egy SLE-ben szenvedő betegen életet veszélyeztető vérzés alakult ki. A beteg vizsgálata a szerzett faktor XIII (FXIII) deficiencia egy új, eddig nem leírt formájának a felismeréséhez vezetett. A beteg plazmájában FXIII aktivitás, FXIII komplex, FXIII A és B alegység antigén nem volt kimutatható, míg trombocitákban a FXIII aktivitás és FXIII-A antigén normál volt. A súlyos vérzést egy autoantitest okozta, mely a komplexben lévő és szabad FXIII-B-hez egyaránt kötődött és nagyon kifejezetten meggyorsította eliminációjukat a keringésből.